

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-157322

(43)Date of publication of application : 03.06.1994

(51)Int.Cl.

A61K 31/725

A61K 31/715

C08B 37/08

C08B 37/10

(21)Application number : 05-191490

(71)Applicant : CRINOS IND FARMACOBIOLOG SPA

(22)Date of filing : 02.08.1993

(72)Inventor : GIUSEPPE PRINO
ENNIO LANZALOTTI
BENNET KASS
LAURA FERRO

(30)Priority

Priority number : 92MI 1881 Priority date : 31.07.1992 Priority country : IT

(54) APPLICATION METHOD OF POLYSACCHARIDE TO TREATMENT OF ACUTE NEUROPATHY

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a polysaccharide useful for the treatment of the maladies such as traumatic and ischemic peripheral neuropathies and neuropathies caused by poisons.

CONSTITUTION: The polysaccharide can be applied for the treatment of the neuropathy caused by dosage of nervgepoisonous compound, ischemia or trauma. The polysaccharide is preferably glucosaminoglycan, its mixture, demarcation or its derivative. The glucosaminoglycan comprises heparin, heparitin sulfate, chondroitin 4-sulfate, chondroitin 6-sulfate, dermatan sulfate, hyaluronic acid or mixture of glucosaminoglycan.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.04.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3264560

[Date of registration] 28.12.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

特開平6-157322

(43) 公開日 平成6年(1994)6月3日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	F I
A61K 31/725	AAP	8314-4C
31/715		8314-4C
C08B 37/08	Z	7329-4C
37/10		7329-4C

審査請求 未請求 請求項の数34 (全14頁)

(21) 出願番号 特願平5-191490
(22) 出願日 平成5年(1993)8月2日
(31) 優先権主張番号 M I 9 2 A 0 0 1 8 8 1
(32) 優先日 1992年7月31日
(33) 優先権主張国 イタリア (I T)

(71) 出願人 591153097
クリノス インドゥストリア ファルマコ
ビオロジカ エス. ピ. ア.
イタリア 22079 コモ ヴィラ グアル
ディア ピアッツア 20 セッテンブレ
2
(72) 発明者 ジュゼッペ プリーノ
イタリア 20100 ミラノ ヴィア カラ
ッチョロ 92
(72) 発明者 エンニオ ランツァロッティ
イタリア 20141 ミラノ ヴィア モン
ティ サビーニ 13
(74) 代理人 弁理士 谷 義一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性末梢神経障害におけるポリサッカリドの適用方法

(57) 【要約】

【構成】 本発明にもとづくポリサッカリド適用方法は、ポリサッカリドを神経毒化合物投与、虚血または外傷による神経障害に適用することを特徴とし、好ましくは、ポリサッカリドはグリコサミノグリカンおよびその混合物、分画またはその誘導体であることを特徴とする。このグリコサミノグリカンはヘパリン、ヘパリチン硫酸、コンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸、またはグリコサミノグリカンの混合物からなる。

【効果】 外傷および虚血性末梢神経障害の治療、さらには毒性末梢神経障害に有効に作用し、これらの疾患の治療に好適に用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 急性神経障害治療薬のプレパレーションにポリサッカリドを用いることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項2】 請求項1記載のポリサッカリド適用方法において、前記神経障害は外傷および虚血が原因である急性神経障害であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項3】 請求項1記載のポリサッカリド適用方法において、前記神経障害は毒が原因である急性神経障害であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項4】 請求項2記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドはグリコサミノグリカンおよびその混合物、分画またはその誘導体であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項5】 請求項4記載のポリサッカリド適用方法において、前記グリコサミノグリカンはヘパリン、ヘパリン硫酸、コンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項6】 請求項5記載のポリサッカリド適用方法において、前記グリコサミノグリカンはヘパリンであることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項7】 請求項4記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドは、グリコサミノグリカンの混合物からなり、前記グリコサミノグリカン混合物の組成は、

遅く移動するヘパリンを10～20%と、
速く移動するヘパリン+ヘパリン硫酸を40～60%と、

デルマトン硫酸を20～35%と、
コンドロイチン硫酸A+コンドロイチン硫酸Cを0～8%と含むことを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項8】 請求項4記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドはヘパリンの分画によって得られたグリコサミノグリカンであることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項9】 請求項8記載のポリサッカリド適用方法において、前記ヘパリンの分画によって得られたグリコサミノグリカンは、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が1.8から2.5までの範囲内であり、かつ分子量が4500から18000までの範囲内であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項10】 請求項4記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドはデルマトン硫酸の分画によって得られたグリコサミノグリカンであることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項11】 請求項10記載のポリサッカリド適用方法において、前記デルマトン硫酸の分画によって得られたグリコサミノグリカンは、硫酸基とカルボキシル

基とのモル比が1.1であり、かつ分子量が6000であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項12】 請求項4記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドはヘパリン硫酸の分画によって得られたグリコサミノグリカンであることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項13】 請求項12記載のポリサッカリド適用方法において、前記ヘパリン硫酸の分画によって得られたグリコサミノグリカンは、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が1.4であり、かつ分子量が7500であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項14】 請求項4記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドは、BP620906に開示されたように、ヘパリンをNaIO₄で処理し、続いてNaBH₄で処理することによって得られたグリコサミノグリカン誘導体であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項15】 請求項14記載のポリサッカリド適用方法において、前記ヘパリンのグリコサミノグリカン誘導体は、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が2.2であり、かつ分子量が9900であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項16】 請求項4記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドはヘパリンを硫化することによって得られたグリコサミノグリカン誘導体であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項17】 請求項16記載のポリサッカリド適用方法において、前記ヘパリンを硫化することによって得られたグリコサミノグリカン誘導体は、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が3.5であり、かつ分子量が4800であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項18】 請求項4記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドはグリコサミノグリカン、コンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸およびデルマトン硫酸のヘキサミン単位の炭素原子2に結合した窒素原子を硫化することによって得られたグリコサミノグリカン誘導体であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項19】 請求項18記載のポリサッカリド適用方法において、前記グリコサミノグリカン誘導体は、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が1.04から2までの範囲内であり、かつ分子量が4000から27600までの範囲内であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項20】 請求項4記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドは、ヘキサミン単位の炭素原子6に結合した水酸基および炭素原子2に結合した窒素原子におけるヒアルロン酸の硫化によって得られ

たグリコサミノグリカン誘導体であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 2 1】 請求項 2 0 記載のポリサッカリド適用方法において、前記ヒアルロン酸の硫化によって得られたグリコサミノグリカン誘導体は、硫酸基とカルボキシ基とのモル比が 1. 0 4 から 1. 8 までの範囲内であり、かつ分子量が 8 0 0 0 から 1 8 0 0 0 までの範囲内であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 2 2】 請求項 2 記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドはデキストランであることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 2 3】 請求項 2 2 記載のポリサッカリド適用方法において、前記デキストランは、分子量が 5 0 0 0 0 0 であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 2 4】 請求項 2 記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドはデキストラン硫酸であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 2 5】 請求項 2 4 記載のポリサッカリド適用方法において、前記デキストラン硫酸は、分子量が 5 0 0 0 0 で、かつ硫酸含有量が 1 5. 6 % であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 2 6】 請求項 2 記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドはペントサンポリ硫酸であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 2 7】 請求項 3 記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドは、グリコサミノグリカンであることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 2 8】 請求項 3 記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドは、グリコサミノグリカンの混合物であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 2 9】 請求項 2 8 記載のポリサッカリド適用方法において、前記グリコサミノグリカン混合物の組成は、

遅く移動するヘパリンを 1 0 ~ 2 0 % と、
速く移動するヘパリン+ヘパラチン硫酸を 4 0 ~ 6 0 % と、

デルマトン硫酸を 2 0 ~ 3 5 % と、
コンドロイチン硫酸 A +コンドロイチン硫酸 C を 0 ~ 8 % と含むことを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 3 0】 請求項 1 記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドは薬学的に許容される塩の形状となっていることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 3 1】 請求項 3 0 記載のポリサッカリド適用方法において、前記ポリサッカリドの薬学的に許容される塩のカチオンは、ナトリウム、カルシウムまたはマグネシウムであることを特徴とするポリサッカリド適用方

法。

【請求項 3 2】 請求項 3 1 記載のポリサッカリド適用方法において、対応する投薬形態は、非経口投与または経口投与であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 3 3】 請求項 3 2 記載のポリサッカリド適用方法において、前記非経口投与の投薬形態は、密閉アンブレに入れられた滅菌無熱性溶液または密閉アンブレに入れられて水溶性滅菌溶媒に溶解される凍結乾燥物であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【請求項 3 4】 請求項 3 2 記載のポリサッカリド適用方法において、前記経口投与の投薬形態は、カプセルまたは錠剤であることを特徴とするポリサッカリド適用方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】本発明は、ポリサッカリドを毒による急性末梢神経障害の治療と同様に、外傷および虚血による急性末梢神経障害の治療における有効な薬剤として用いる方法に関する。

【0 0 0 2】なお、本明細書の記述は本件出願の優先権の基礎たるイタリア国特許出願第 M I 9 2 A 0 0 1 8 8 1 号の明細書の記載に基づくものであって、当該イタリア国特許出願の番号を参照することによって当該イタリア国特許出願の明細書の記載内容が本明細書の一部分を構成するものとする。

【0 0 0 3】

【従来の技術】神経または神経組織の虚血は、主に 2 通りに誘導されるもので、血管疾患 (vasculopathies) 等の内因性にもとづく場合と、外傷、圧迫または障害等の外因性にもとづく場合とがある。

【0 0 0 4】虚血が四肢を冒した場合、もつとも遠位の部分は運動および感覚神経の機能的変質によって付随的に冒される。いくつかの特異的な症例では、血管疾患によって引き起こされる単神経障害は、腓骨神経でみられるように、すでに弱った神経血管新生によって助長される。

【0 0 0 5】急性末梢神経障害は、一般的に以下のこの結果として生じる。

【0 0 0 6】・塞栓症および急性血栓症による大動脈閉塞。虚血は、一般に心臓病または進行アテローム性動脈硬化症に冒された患者において認められる。この場合、大腿および腸骨の動脈においてももつとも頻繁に起こる。

【0 0 0 7】・四肢の近位部分での外傷によって引き起こされる小動脈閉塞。

【0 0 0 8】・末梢神経の機械的損傷。この損傷によって遠位神経分節のウォラー変性を誘発する。損傷が圧迫による場合、軸索障害は神経伝導の阻害 (神経行動不能症) または神経の近位-遠位変性 (軸索断裂症) のどちらかを引き起こすであろう。

【0009】従来、そのような病変に対する薬物の有効性は、外傷実験モデルによっても示されることがすでに知られていた。しかし、病巣の虚血によるそのようなモデルは、再現性のない結果を与えるものであって方法的に信頼性がない。

【0010】虚血または外傷による末梢神経障害に対する薬物活性を示すために、頻繁に用いられる薬学的試験は以下の通りである。

【0011】・損傷部位での神経再生の程度（神経突起形成（neuritogenesis）に関するインビトロ試験、参照文献：ゴリオらの「神経可塑性に対する薬物活性の評価に関する実験モデル」（A. Gorio et al.: "Experimental models for the evaluation of drugs active on neuronal plasticity", Biological Psychiatry, Elsevier Science Publishers, vol. II, pages 192-194, 1991）。この試験は、薬物が損傷部位からの軸索伸長に影響を及ぼすことができるかを明らかにする。ヒト急性末梢神経障害において、生理的な神経再生はたいていの場合かなり微弱であり、一般に顕著な程度で神経再生が達成されることはない。

【0012】・外傷または神経毒物質投与による損傷後の神経組織の神経保護（ギウリオらの文献：Di Giulio et al., Brain Res. 342 405-408）。神経再生のそれ以上のステップは神経が生き残っていることに依存しているため、この試験で薬物活性を評価するにはたいへんむずかしい。

【0013】すべての結合組織の細胞外マトリックスに含まれるポリマーである多糖類のなかでも、スルホン多糖類またはグリコサミノグリカンの生物学的重要性は、すでに認識されている。

【0014】なお、細胞外マトリックスにおけるそれらの特異的機能に関しては証明されていない。なぜなら、いままでのところこの分野では主にプロテオグリカンが注目されてきたからである。プロテオグリカンは結合組織に多く含まれており、グリコサミノグリカンおよびタンパク質を含む高分子集合体である。

【0015】したがって、スルホン多糖類に関する入手可能な情報では、神経細胞生理におけるその役割についての知見はわずかしかなない。

【0016】かなり最近になって、これらのポリマーが組織の発生学的形態形成過程に対して影響を及ぼすことが示唆されている。サイエンスに掲載されたブリティスの論文「網膜のニューロンパターン形成調節剤としてのコンドロイチン硫酸」（P.E. Brittis, "Chondroitin sulfate as regulator of neuronal patterning in the retina", Science, 255, 733-736, 1992）は、胚網膜の細胞発生および分化に対するこのポリマーの役割に関する証拠を開示している。この研究から、コンドロイチン硫酸は外形状、未分化胚細胞の生物学的分化に対して影響を及ぼすものと結論することができよう。

【0017】神経障害の特定分野においてグリコサミノグルカンを治療に用いることに関係した従来の知見は、特に欧州特許出願第0513513号（EP-A-0513513）に開示されている。この文献では糖尿病性神経障害の治療においてグリコサミノグリカンが活性を示すことが明らかにされている。この活性は、オスのアルビノラットにアロキサン皮下注射によって糖尿病を誘発させた実験モデルによって示された。すなわち、薬物投与18週後に動物を屠殺して消化管から十二指腸および空腸を取り出して細かく切断して試料とし、これをラジオイムノアッセイにかけてこの試料に含まれるサブスタンスPおよびMe t-エンケファリンを定量した。

【0018】上記定量の結果によれば、グリコサミノグリカン（用量6mg/kg/日または15mg/kg/日を皮下経路。検討されているポリマーにもとづく）による薬学的処置によって糖尿病による両神経ペプチドの減少が実質的に阻害されることが認められた。

【0019】

【発明が解決しようとする課題】しかし、この分野の文献によって入手可能な情報によれば、糖尿病による誘発の時期と神経生理学的変化とが相互に関連していることが示唆される。例えば、シャーマおよびトーマスの論文「実験的糖尿病における末梢神経の構造と機能」神経科学第23巻1～15頁1974年（Sharma A.K., Thomas P.K., "Peripheral nerve structure and function in experimental diabetes" J. Neurol. Sci. 23 1-156 1974）によれば、ラットにおいてアロキサン-ストレプトマイシンにより実験的に糖尿病が誘発されてから半年から1年経過した後で運動神経の伝導速度が顕著に減少したことが認められたが、神経構造に関しては形態学的には顕著な損傷は認められなかった。さらに、軸索疾患は、16週後のアロキサン糖尿病ラットにおいて認められる慢性期の典型的な病理学的特徴であることが知られている（Powell et al., Acta Neuropathol. 65, 128-137, 1984）。したがって、これらのことから、EP-A-0513513に開示されたアロキサン誘導糖尿病実験における18週という期間は、神経障害を生じさせるのには明かに短すぎると結論できる。

【0020】したがって、従来技術によっては急性末梢神経障害に対するグリコサミノグリカンの活性に関して、後述する本願の実験によって示されるいかなる結論も引き出すことができない。

【0021】また、EP-A-0513513において与えられたグリコサミノグリカン活性を支持する神経ペプチド濃度の上昇に関する知見からでも、上記化合物の治療上の有効性を評価するための確信がまだ得られないものと考えられる。

【0022】実際のところ、従来技術から、そのような関係に通常採用される薬学的方法は、上記特許出願に言及されたものと異なっている。

【0023】例えば、単行本「**ガングリオンドおよび神経毒 (Gangliosides and modulation of neuronal function)**」(Hinrich Rhamann 編集、Springer Verlag、1987年)の531～546 ページ(特に532 ページに注目)にあるK. スズキの論文「**ガングリオンドおよび神経障害 (Gangliosides and neuropathy)**」では、糖尿病性神経障害のスクリーニング活性に関する薬学的方法として、神経伝導速度、聴性脳幹電位、軸索直径、節間距離、ミエリン構造、および損傷神経の再神経支配が報告されている。

【0024】また、学会誌「**末梢神経障害に関する国際会議、1981年6月24日～25日、マドリッド**」(“International Conference on peripheral neuropathies 24th - 25th June 1981 -Madrid” Excerpta Medica International Congress Series 5921981)の32～33ページのA. ゴリオ (A. Gorio) : 「**末梢神経障害の薬学的様相 (Pharmacological aspects of peripheral neuropathy)**」、特にその「**糖尿病性神経障害**」の段落に同じようなことが報告されている。

【0025】糖尿病性神経障害の治療に用いられる化合物の他のクラス、すなわちアルドースレダクターゼ阻害剤に関して同様な結論が引き出せる。

【0026】総説：ポール・ベンフィールド「**アルドースレダクターゼ阻害剤および糖尿病の末期合併症**」(Paul Benfield “Aldose reductase inhibitors and late complications of diabetes” Drug 32 (Suppl. 2) 43-55, 1986)に示されているように、上記物質の薬理学的研究によれば、神経伝導速度の実験モデルにおいて糖尿病性神経障害に対する活性が認められた。

【0027】さらに、神経障害に関連した軸索内輸送の実験モデルの重要性は、さらにA. ゴリオ編集の単行本「**神経再生**」(“Neuroregeneration” edited by A. Gorio, Raven Press, 1983)の289～320 ページにあるA. ゴリオらの文献によって支持される。

【0028】以上のことから、本発明の目的は、急性神経障害に対するポリサッカリドの適用方法について検討することである。

【0029】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために、本発明にもとづくポリサッカリド適用方法は、急性神経障害治療薬のプレパレーション (preparation) にポリサッカリドを用いることを特徴とするもので、神経障害は毒、外傷および虚血が原因である急性神経障害である。この神経障害は毒が原因である急性神経障害である。また、好ましくは、ポリサッカリドはグリコサミノグリカンおよびその混合物、分画またはその誘導体であることを特徴とする。このグリコサミノグリカンはヘパリン、ヘパリン硫酸、コンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸、またはグリコサミノグリカンの混合物からなり、好ましくは

グリコサミノグリカンの混合物の組成は、遅く移動するヘパリンを10～20%と、速く移動するヘパリン+ヘパリン硫酸を40～60%と、デルマトン硫酸を20～35%と、コンドロイチン硫酸A+コンドロイチン硫酸Cを0～8と含むことを特徴とする。さらに、好ましくはヘパリンの分画によって得られたグリコサミノグリカンは、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が1.8から2.5までの範囲内であり、かつ分子量が4500から18000までの範囲内である。また、ポリサッカリドはデルマトン硫酸の分画によって得られたグリコサミノグリカンでもよい。この場合、このグリコサミノグリカンは、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が1.1であり、かつ分子量が6000であることが好ましい。さらに、ポリサッカリドはヘパリン硫酸の分画によって得られたグリコサミノグリカンでもよい。この場合、このグリコサミノグリカンは、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が1.4であり、かつ分子量が7500であることが好ましい。同様にポリサッカリドは、英国特許第620906号 (BP 620906) に開示されたように、ヘパリンをNaIO₃で処理し、続いてNaBH₄で処理することによって得られたグリコサミノグリカン誘導体でもよい。この場合、このグリコサミノグリカン誘導体は、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が2.2であり、かつ分子量が9900であることが好ましい。上記のポリサッカリドはヘパリンを硫化することによって得られたグリコサミノグリカン誘導体でもよく、この場合、この誘導体は、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が3.5であり、かつ分子量が4800であることが好ましい。さらに、ポリサッカリドはグリコサミノグリカン、コンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸およびデルマトン硫酸のヘキサミン単位の2位の炭素原子に結合した窒素原子を硫化することによって得られたグリコサミノグリカン誘導体であることを特徴としてもよい。好ましくは、このグリコサミノグリカン誘導体は、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が1.04から2までの範囲内であり、かつ分子量が4000から27600までの範囲内である。ポリサッカリドは、ヘキサミン単位の炭素原子6に結合した水酸基および炭素原子2に結合した窒素原子におけるヒアルロン酸の硫化によって得られたグリコサミノグリカン誘導体であってもよく、好ましくは、このようなグリコサミノグリカン誘導体は、硫酸基とカルボキシル基とのモル比が1.04から1.8までの範囲内であり、かつ分子量が8000から18000までの範囲内であることが好ましいことを特徴とする。ポリサッカリドがデキストランである場合、好ましくは分子量が500000であることが好ましいことを特徴とする。ポリサッカリドがデキストラン硫酸である場合、好ましくは分子量が5000で、かつ硫酸含有量が15.6%であることが好ましいことを特徴とする。ポリサッカリドはペントサンポリ硫酸である場合、

このポリサッカリドは、好ましくはグリコサミノグリカンであることを特徴とする。

【0030】このようなポリサッカリドは、好ましくは薬学的に許容される塩の形状となっていることを特徴とし、さらに好ましくは薬学的に許容される塩のカチオンは、ナトリウム、カルシウムまたはマグネシウムであることを特徴とする。そして、これに対応する投薬形態は、非経口投与または経口投与で、好ましくは非経口投与の投薬形態は、密閉アンプルに入れられた滅菌無熱性溶液または密閉アンプルに入れられて水溶性滅菌溶媒に溶解される凍結乾燥物であり、一方経口投与の投薬形態は、カプセルまたは錠剤である。

【0031】

【作用】神経再生のインビトロ実験において、ポリサッカリドは神経細胞での神経突起または軸索の形成に対するPMA（4b-ホルボール-12b-ミリステート-13a-アセテート）の阻害効果に対して拮抗する。また、インビトロ実験においてポリサッカリドは、神経毒化合物投与または外傷がラットの神経系において病的状態を誘発するのに対して反対に作用する。

【0032】

10 【実験例】本発明において試験された物質を表1および表2に示す。

【0033】

【表1】

化 合 物	分子量 $\times 10^3$	全硫黄 重量%	基の分子比 $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$	製造元、バッチ番号、他の化学、 他の化学薬品、パラメータ、注釈
ヘパリン	14	-	2.1	シグマ (Sigma)、コード番号 H 7005
速く移動するヘパリン (HPFMと略す)	6	-	1.8	クリス (Crinos Res. Lab.)、バッチ番号 V0161C
遅く移動するヘパリン (HPSMと略す)	18	-	2.2	クリス、バッチ番号 V0174B
低分子量ヘパリン	4.5	-	2.5	シグマ、コード番号 H 05640
ヘパリン硫酸	4.8	-	3.5	ロソニ (Ist. Ronzoni)、バッチ番号 G 1079/7
NaIO ₄ -酸化ヘパリンおよび NaBH ₄ -還元ヘパリン	9.9	-	2.2	ロソニ、バッチ番号 G 1160/B
ヘパリンチン硫酸 (HSと略す)	13	-	1.6	シグマ (Syntex)、バッチ番号 911013/B
低分子量ヘパリンチン硫酸	7.5	-	1.4	シグマ、コード番号 H 5393
グリコサミノグリカン混合物 (GAG混合物と略す) バッチ:				クリス
・GAG混合物バッチ番号 1				HPFM° HPFM+HS° DeS° CHSA+C°
・GAG混合物バッチ番号 2				10 60 22 8
・GAG混合物バッチ番号 3				13 49 34 4
・GAG混合物バッチ番号 4				20 40 35 5
・GAG混合物バッチ番号 5				17 54 29 0
				16 57 20 7

注釈：横棒は、相当する測定を実施していないことを意味する。

・ Mascellani G. et al., II Farmaco Ed, Part. 43 165-175 1988.

・ 電気泳動による GAF の定量。データは重量%で表す。略号 CHSA+C は CHSA+CHSC の全体量を示すためにあり、アッセイでは一緒に決定される。

化 合 物	分子量 $\times 10^3$	全硫黄 重量%	基の分子比 $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$	製造元、バッチ番号、他の化学、 他の化学薬品、パラメータ、注釈
ヒアルロン酸	1,100	—	—	ザノニ (Zanoni Lab. S) バッチ 番号5197
ヒアルロン酸N, 6 硫酸	8	—	1.8	ロツニ バッチ 番号G1046
ヒアルロン酸N硫酸	18	—	1.1	ロツニ バッチ 番号G1045
デキストラン	500	—	—	ファルマ (Pharmacia) バッチ 番号NK-05613
デキストラン硫酸	5	15.6	—	ジマ コード 番号D7037
ペントサンポリ硫酸	3	21.9	—	ジマ コード 番号P8275
コンドロイチン4 硫酸 (コンドロイチン硫酸A)	30	—	1.1	クリス バッチ 番号V0210A
コンドロイチンN, 4 二硫酸	4	—	2	ロツニ バッチ 番号G1372
コンドロイチン4, 6 二硫酸	27.6	—	1.87	ロツニ バッチ 番号G1136
コンドロイチン6 硫酸 (コンドロイチン硫酸C)	71	—	1.15	クリス バッチ 番号V0212A
コンドロイチンN, 6 二硫酸	7.5	—	2	ロツニ バッチ 番号1373
デルマトン硫酸 (DeS)	30	—	1.04	クリス バッチ 番号V0176H
低分子量デルマトン硫酸	6	—	1.1	ロツニ バッチ 番号G1374
デルマトン6 硫酸	6.4	—	1.05	ロツニ バッチ 番号G1374
デルマトンN, 4 二硫酸	5	—	2	ロツニ バッチ 番号G1396
デルマトン4, 6 二硫酸	25	—	2	ロツニ バッチ 番号G938
* 表1を参照せよ。				S ミラン (Milan)、イタリヤ

【0035】特に、スルホムコポリサッカライドの場合、これらの表に与えられた薬物の分析的特徴は、実験に用いられるポリマーは問題になっているグリコサミノグリカンに関しての従来の定義に当てはまるという客観的証拠としてみなされるべきである。ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸A (コンドロイチン4 硫酸)、コンドロイチン硫酸C (コンドロイチン6 硫酸) およびデルマトン硫酸 (コンドロイチン硫酸B) の各術語は、多くの論文において使用されているもので当業者にはかなり良

く知られた術語である。なお、具体的には下記の論文を参照せよ。

【0036】ヘパリンに関して：

カズの文献：「ヘパリンの構造および生物学的活性」

(B. Casu: "Structure and biological activity of Heparin" Advances in Carbohydrate Chemistry 43, 51, 1985)

ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸AおよびC、デルマトン硫酸、ヘパリン硫酸に関して：

スコットの文献:「酸性ポリサッカライドのアッセイにおける脂肪族アンモニウム塩」(J.E. Scott: "Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides" *Methods of biochemical analysis*, 8, 148-149, 1964)

リンドハルらの文献:「グリコサミノグリカンおよびそれに結合する生物学的高分子」(U. Lindhal et al.: "Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules" *Annual Review of Biochemistry*, 47, 387-390, 1978)

バーマらの文献:「ムコポリサッカライド 健康および病気における体液のグリコサミノグリカン」(R. Varma et al.: "Mucopolysaccharides-glycosaminoglycans of body fluid in health and disease" (De Guyter ed.) pages 8, 12-18 and 20-23, 1983)

ヘパリン硫酸に関しては、さらに、

リンカーらの論文:「ヘパリン硫酸」(R. Linker et al.: "Heparitin sulfate" *B.B.A.* 29, 443, 1958)

ブリマコンベの論文: J. S. Brimacombe: "Mucopolysaccharides (Elsevier Publ. Company), pages 138-140, 1964

ポリサッカライド誘導体、例えばペントサンポリスルフェートは本発明の分野に関連した数々の権威ある文献あるいは広範に出回っている書籍等にその重要な化学的および生理化学的特性が記載されており、当業者にとって既によく知られた化合物である。例えば、メルク・インデックス (Index Merk) 10版を参照せよ。さらに、表1および表2に示された他の化合物またはその単離方法は下記の文献に記載されている。

【0037】「速く移動する (fast moving)」および「遅く移動する (slow moving)」ヘパリンは、B. カスらの文献 (B. Casu et al., *Arzneim. Forsch./drug Res.* 36 (I) 4 637-642, 1986) に記載された方法にもとづいて、クリノス研究所 (Crinos Laboratories) において肺ヘパリンから調製した。

【0038】過ヨウ素酸化ナトリウムによる酸化とそれに続くホウ化水素ナトリウムによる処理とによって得られるヘパリン誘導体を、英国特許第620906号に開示された方法にもとづいて調製した。

【0039】下記の薬理学的実験において検討したグリコサミノグリカン混合物を、研究室規模で一度に50kgの組織、十二指腸または小腸から抽出して米国特許第3,936,351号に開示された方法にもとづいて調製した。

【0040】さらにヘパリンの硫酸化をナギらの文献 (A. Nagi et al.: "Supersulfated heparin fragment s, a new type of low-molecular weight heparin" *Biochem. Pharmacol.* 36, 12, 1985-1900, 1987) にもとづいておこなった。

【0041】グリコサミノグリカン混合物の定量に用い

た電気泳動法は、基本的にはカペレッティらの文献

(R. Cappelletti et al., *Anal. Biochem.* 99, 311-315, 1979) 開示された方法にもとづくものであるが、以下の実験条件を採用した。

【0042】第一回目の電気泳動: 0.1M酢酸バリウム緩衝液 (pH5) を用い、また150Vの電圧を3分間かけて行った。

【0043】第二回目の電気泳動: 0.1M酢酸バリウム緩衝液/エタノール混合液 (100:3, v/v) を用い、また150Vの電圧を20分間かけて行った。

【0044】第三回目の電気泳動: 0.1M酢酸バリウム緩衝液/エタノール混合液 (100:20, v/v) を用い、また150Vの電圧を20分間かけて行った。

【0045】この電気泳動分析では、ロンゾニ・インスティテュート (Ronzoni Institute, Milan, Italy) によって特性が記述されたグリコサミノグリカン標準試料を用いた。

【0046】グリコサミノグリカンのエステル化誘導体に関して本願において用いられた化学用語は、例えば欧州特許出願E-P-A891086105.0に開示されているように、従来のものに従っている。

【0047】本願で開示されたエステル化誘導体は、もとなるポリサッカライドの名前の後にNの文字および/または数字4および/または6を付けることによってヘキソサミン環の2位の位置にある炭素原子に共有結合した窒素原子が置換されることを示している。数字の4および/または6は、硫酸イオンによって置換された同一の糖の水酸基を識別する。

【0048】新しく提案される治療目的に利用されるコンドロイチン硫酸、デルマトンおよびヒアルロン酸のグリコサミノグリカン誘導体を導く硫酸化反応 (sulphation reaction) は、ヘキソサミンのピラノース環に排他的に硫酸基を導入させるもので、それとともにウロン酸はそのようなポリマーの二量体繰返し単位を構成する。

【0049】ヒアルロン酸N, 4二硫酸、コンドロイチンN, 4二硫酸、コンドロイチンN, 6二硫酸およびN, 4二硫酸は、欧州特許出願E-P-A891076105.0に開示された方法にもとづいて調製した。ヒアルロン酸N硫酸は、上記特許出願の実施例6に示した方法にもとづいて調製された。コンドロイチン4, 6二硫酸およびデルマトン4, 6二硫酸は、ナガサワらの方法 (K. Nagasawa et al., *Carbohydr. Res.* 158, 183-190, 1986) に基本的にもとづいてコンドロイチン4硫酸およびデルマトン硫酸からそれぞれ調製された。ここでの反応時間および温度は、それぞれ1時間および0℃である。本願で用いた付加物ピリジン-SO3は、引例よりもモル過剰となっており、グリコサミノグリカン二量体サッカライド単位のもル数の24倍の量となっている。

【0050】インテグロ神経突起形成試験では、SY5 SY型神経芽腫細胞の神経培養を用いた。神経突起形成は、培地から血清を除くことによって誘導した。細胞分裂が停止した後に神経突起形成が起こった。48時間後に完全な神経形成が達成されて、すべてのSY5 SY細胞に神経突起が観察された。

【0051】この培地に血清除去時に 10^{-8} MのPMA溶液を加えると神経突起形成に対して負の効果を表し、そのため48時間後で観察された神経突起が形成された細胞は全体の40%にすぎなかった。

【0052】上記実験モデルにもとづいて、スクリーニングの際にPMAとともに添加された化合物の濃度は、それぞれ 10^{-8} Mおよび 10^{-6} Mである（各濃度について実験を2繰り返しした）。

【0053】培地にPMAのみを添加した場合に観察された神経突起形成の平均値を100として、実験結果の平均値を計算した。その結果を表3、表4および表5に示す。

【0054】

10 【表3】

PMA 10^{-8} M存在下でのグリコサミノグリカン（濃度 10^{-6} M, 10^{-8} M）によって誘導される 5YSY 神経芽腫細胞培養における神経突起形成の再開。ここで検討した化合物： ヘパリンおよびその誘導体、 ヘパラン硫酸および抽出物からなるグリコサミノグリカン混合物		
化 合 物 (表1を参照)	濃 度	
	10^{-6} M	10^{-8} M
PMA	(100)	(100)
ヘパリン	155	250
速く移動するヘパリン (HPFMと略す)	130	117
遅く移動するヘパリン (HPSMと略す)	120	100
低分子量ヘパリン	105	168
ヘパリン硫酸	180	148
NaIO ₄ によって酸化した後、NaBH ₄ によって還元されたヘパリン	190	162
ヘパリチン硫酸	130	100
低分子量ヘパリチン硫酸	102	125
GAG 混合物バッチ番号1	190	225

【0055】

【表4】

PMA 10^{-8} M存在下でのポリサッカリド（濃度 10^{-6} M, 10^{-8} M）によって誘導される 5YSY 神経芽腫細胞培養における神経突起形成の再開。 化合物：ヒアルロン酸およびその誘導体、 デキストランおよびそのエステル誘導体、 ペントサンポリ硫酸		
化 合 物 (表2を参照)	濃 度	
	10^{-6} M	10^{-8} M
PMA	(100)	(100)
ヒアルロン酸	100	130
ヒアルロン酸N,6 二硫酸	140	110
ヒアルロン酸N硫酸	125	120
デキストラン	155	118
デキストラン硫酸	160	130
ペントサンポリ硫酸	170	160

【0056】

【表5】

PMA 10^{-8} M存在下でのグリコサミノグリカン (濃度 10^{-6} M, 10^{-8} M) によって誘導される 5YSY 神経芽腫細胞培養における神経突起形成の再開。化合物：コンドロイチン硫酸、 デルマタン硫酸およびそれらの誘導体		
化 合 物 (表2を参照)	濃 度	
	10^{-6} M	10^{-8} M
PMA	(100)	(100)
コンドロイチン4硫酸	182	100
コンドロイチンN,4 二硫酸	140	107
コンドロイチン6硫酸	114	129
コンドロイチンN,6 二硫酸	138	104
コンドロイチン4,6 二硫酸	102	182
デルマタン硫酸	217	162
低分子量デルマタン硫酸	165	105
デルマタン6硫酸	114	142
デルマタンN,4 二硫酸	116	104
デルマタン4,6 二硫酸	102	132

【0057】ここで、実験結果はPMAとポリサッカリドとの仮定される複合化によるものではない。なぜなら、表3ないし表5に示されているように、薬理学的活性は均等にポリマー濃度と反比例の関係にあり、このことは明かに仮定される複合化とはまったく異なるものである。

【0058】また、上記活性は、上記化合物が未分化細胞の分化過程に影響を及ぼすことができる可能な状況に起因するものではなく、コンドロイチン硫酸を扱った上記引例から誤って引き出されたものである。

【0059】実際、神経突起発生実験ではそれよりはむしろすでに分化した細胞を用いた。この試験で得られた結果によれば、ポリサッカリドは異なった活性を示すことが明かである。ヘパリンおよびグリコサミノグリカン混合物バッチ番号1 (表3は、低濃度 (10^{-8} M) での試験ではもっとも活性の高い化合物であった。なお、これらの物質がたとえ一層低い濃度 (10^{-10} および 10^{-12}) であっても同一の神経突起成長得られた。

【0060】 10^{-6} Mの用量でもって活性を示す化合物のなかでも、GAG混合物バッチ番号1およびデルマタン硫酸はここで言及しておく必要がある。

【0061】これらの知見は、さらに外傷および毒障害によってそれぞれ誘発される急性神経障害の実験モデルによって得られた結果により、さらに確信を深めることができる。

【0062】左坐骨神経を0.5 cm切除して外傷を負わせた。神経細胞に結合したこの神経の一部分である近位断端は、神経再生を阻止するために切除部位でもって

縛り付けられた (Di Giulio et al., 前掲)。

【0063】このような坐骨神経の永久損傷は、知覚神経軸索の退行的変質を引き起こし、腰部脊椎の膠様質の中央部分に変性萎縮をもたらす。萎縮は、軸索切断から10～15後に生じ、それに伴ってサブスタンスP、すなわち軸索に含まれるペプチドの濃度が低下が認められた。腰部脊椎背角の膠様質において同一損傷のさらなる結果として、me t-エンケファリン含有介在ニューロンの付随的変質 (ニューロン切断変性または経シナプス変性) が認められた。

【0064】その結果、実験的に誘導された障害によって、サブスタンスPおよびme t-エンケファリン濃度の顕著な減少が引き起こされ、約50%の存在 正常値の平均にあたいする。

【0065】本実験モデルでは、50匹のラットを用いた。

【0066】外傷を負わせてから24時間経過後にそれぞれ5匹の動物からなる6つの群を作った。6つの群れのうち5つの群れの動物に、下記の化合物を含む300ないし500 mlの生理的食塩水を腹腔内に注射した (一群に一化合物投与、動物を固定して対応する用量 (mg/kg) を投与)。

【0067】

コンドロイチン4硫酸 (5 mg/kg)

ヘパリン (0.25 mg/kg)

グリコサミノグリカン混合物バッチ番号 (0.25 mg/kg)

グリコサミノグリカン混合物バッチ番号2 (0.25 m

g / k g)

グリコサミノグリカン混合物バッチ番号 3

(1 m g / k g)

グリコサミノグリカン混合物バッチ番号 4 (5 m g / k g)。

【0068】対照群は2種類用意した。一方は処置していない動物からなる群（未処置対照群）で、他方はすでに傷を受けた上記6群の予備群（処置対照群）である。

【0069】生理的食塩水を対照群に注射した。注射は実験的損傷を負わせた日の翌日から一日一回繰り返して 10 【表6】

行い、神経損傷3週間後に実施する屠殺の前日に中止した。

【0070】屠殺後ただちに、脊髓随質の腰部分節を素早く切り出して液体窒素（-80℃）で凍結した。ニューロペプチド含有量は上記論文（Di Giulio et al. (1985)）に記載されたラジオイムノアッセイによって定量した。サブスタンスP およびmet-エンケファリンの定量結果を表6に示す。

【0071】

坐骨神経の実験的損傷。坐骨神経切除した後に下記用量からなるスルホムコ多糖類の腹腔内投与(i.p)による処置を日ごと実施した場合の脊髓腰椎部に含まれるサブスタンスPおよびmet-エンケファリンの量（ラジオイムノアッセイ法によって測定）

化合物 (表1参照)	用量/日 i.p mg/kg	サブスタンスP ng/mg タンパク質	met-エンケファリン ng/mg タンパク質
未処置対照群	—	10.21±0.13	0.44±0.01
処置対照群	—	6.69±0.23	0.33±0.01
コンドロイチン4硫酸	5	12.68±0.80	0.98±0.05
ヘパリン	0.25	18.49±0.33	1.17±0.09
GAG 混合物b番号2	0.25	16.99±0.94	1.06±0.03
GAG 混合物b番号3	1	12.69±1.03	1.20±0.10
GAG 混合物b番号4	5	17.47±0.29	1.21±0.04
(b = バッチ)			

【0072】両対照群と比較してこれらのニューロペプチド濃度の顕著な増加が認められたことから、これらの結果にもとづいてグリコサミノグリカンおよびその混合物は知覚神経軸索突起の変性から動物を効果的に保護するという結論を引き出すことができる。

【0073】上記表から言えることは、上記ペプチドの全体量は平均して処置対照群の2ないし2.5倍高い。

【0074】さらに、このような比率は、同一物質に関してインビトロ神経突起発生実験で得られたものと等しい（表3ないし表5を参照せよ）。

【0075】ヘパリンとグリコサミノグリカン混合物バッチ番号2、3および4とがコンドロイチン4硫酸よりも高い活性を示すことが表6から明かである。

【0076】特にヘパリンに関しては、上記結果は完全に予想外であると言える。なぜなら、従来から通常の投与量で行うヘパリンによる治療でもって続発性の神経障害が誘発されると考えられていたからである（スピーゲルらの文献：「抗凝集につづく大腿神経障害」(P.G. Spiegel et al., "Femoral-nerve neuropathy secondary to anti-coagulation" The Journal of Bone and Joint Surgery, vo. 56-A n. 2, 425-426, March 1974); ス

ターンの文献：「ヘパリンによる抗凝集治療の合併症としての大腿神経障害」(M.B. Stern et al. "Femoral neuropathy as a complication of heparin anti-coagulation therapy", Clinical Orthopaedics and Related Research, n. 106, 140-142, Jan-Febr. 1975); ジャクソンの文献「ヘパリン誘導骨盤血腫につづく大腿神経障害」: S. Jackson "Femoral neuropathy secondary to heparin induced intrapelvic hematoma" vol. 10/n. 7, 1049-1051, 1987)。

【0077】上記予想したように、知覚機能回復に対するポリサッカリドの有効性も毒性神経障害の実験モデルを用いて研究されてきた（ジョンソンらの文献：Johnsson et al., J. Neurosci. 12 459-475, 1984）。

【0078】さらに、上記実験モデルにおいてポリサッカリドによって明かにされた活性は、すでに述べたように、本発明の第二の実施態様、すなわち毒による急性神経障害治療におけるポリサッカリド使用を構成する。

【0079】ここで指摘しておくべきことは、後者の表現は、神経系に対して毒性を示す薬剤によって起こる末梢神経障害を示している。このような毒性を示す薬剤としては、エメチン、ヘキサバルビタール、バルビター

ル、クロロブタノールおよび新および治療に関するマニュアル等、例えばメルクインデックス第13版1471頁記載されたそのような特性を持つ物質が挙げられる。

【0080】実験モデルは、新生ラットの交感神経系におけるノルアドレナリン (NA) およびドーパミン (DA) 減少にもとづくもので、このような減少は投与量10.0mg/kgの6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) を生後6時間以内に皮下注射して誘導した。

【0081】12匹のラットすべてに処置を施して6匹づつ分けて2つの群にした。このうち、一つの群はグリコサミノグリカンパッチ番号5 (表1に示した組成) を

含む生理的食塩水 (0.9% NaCl 10ml) を、4週間にわたって一日一回5mg/kg用量を腹腔投与した。処置は毒による障害を与えた日の翌日から開始した。対照群は2つで、一つの群は6-OHDA (障害を受けた対照群)、もう一方の群は未処置対照群 (対照群) である。

【0082】屠殺後ただちに、上頸神経節を各動物から切除し、液体窒素でもって-80℃凍結保存した。

【0083】NA量およびDA量をHPLCアッセイによって検討し、表7にその結果を示した。

【0084】

【表7】

6-OHDA投与によって起こる交感神経系の毒性障害。 5mg/kg用量のグリコサミノグリカン腹腔内投与による処置を施した 障害4週間における上頸部神経節のNAおよびDA量の検定		
	ノルアドレナリン ng/神経節	ドーパミン ng/神経節
対照群	22.5±0.5	2.74±0.11
障害を受けた対照群	2.11±0.21	0.86±0.08
GAG 混合物b番号5	12.8±0.11	1.94±0.03
(b = バッチ)		

【0085】この表によれば、ポリサッカリド、好ましくはグリコサミノグリカン、より一層好ましくはグリコサミノグリカン混合物 (組成は後述する比率からなる) が損傷神経再生の実験モデルにおいても有効な薬剤であることがわかった。

【0086】実際のところ、この表から、これらの物質は損傷対照群と比較してノルアドレナリンおよびドーパミンの顕著な増加が認められた。

【0087】そのうえ、このような様相は未処置対照群のものと同程度が等しかった。

【0088】本発明の目的に対して結論すると、上記薬理学的実験によればポリサッカリド、および特にグリコサミノグリカンは外傷および虚血性末梢神経障害の治療、さらに毒性末梢神経障害の治療に好適に用いることができる。

【0089】特に、上記表に挙げられたグリコサミノグリカンに関しては、本願において開示される治療上の使用に関して有効な薬剤はグリコサミノグリカン混合物であり、この混合物においてグリコサミノグリカンの量は以下のように限定される。

【0090】すなわち、遅く移動するヘパリンを10～20%と、速く移動するヘパリン+ヘパラチン硫酸を40～60%と、デルマトン硫酸を20～35%と、コンドロイチン硫酸A+コンドロイチン硫酸Cを0～8%とからなる。

【0091】ポリサッカリドは非経口投与する。投与する用量は一日あたり1ないし1000mg、好ましくは1ないし300mgで、結局は従来からの医学関連規定にもとづく。

30 【0092】本願では、ヘパリンに注目することが大切である。表6に示すように、ヘパリンは通常の用量よりも低い用量で有効性を示す。

【0093】この化合物の抗凝集活性にもとづく副作用を防ぐために条件を整える必要がある。

【0094】非経口投与の場合は、ポリサッカリドの滅菌無熱性溶液を密閉アンプに保存した調剤形態がとられ、これによって筋肉内、皮下および静脈内経路で投与可能となる。また、密閉ボトルに凍結乾燥保存してもよく、この場合は固体に滅菌溶媒を加えることによって即席に溶解する。このような調剤形態は当業者がすでによく知っている賦形剤とともに調剤してもよい。

40 【0095】経口投与の場合の調剤形態は、錠剤、ゼラチンカプセル、被覆 (胃液抵抗性) 錠剤または被覆ゼラチンカプセル、顆粒等である。

【0096】このような調剤に添加される賦形剤は従来から既知のものである。

【0097】経口投与の場合、一日に投与される用量は1ないし1500mg、好ましくは1ないし700mgである。

50 【0098】さらに、本発明にもとづくポリサッカリド

の使用方法は、この分野の文献においてすでによく知られている適切な薬学的に許容される塩を介して投与することが可能である。

【0099】例えば、ナトリウム、カルシウムまたはマグネシウムを有する対応する塩類が挙げられる。

【0100】＜実施例1＞ヘキサミン環の6位にある酸素原子のところにのみ硫酸基を持つデルマトン（デルマトン6硫酸）の合成。

【0101】(A) ガラクトサミンの4位にある水酸基の脱硫酸化 (K. Nagasawa, Carbohydr. Res. 58 47-55, 1977)

ブタ粘膜から採取した5gのデルマトン硫酸を250mlの水に溶解した。この溶液に10mlのアンバーライト樹脂（商標、AmberliteR resin）を酸のかたちで加えた。スラリーを攪拌濾過した。樹脂を完全に洗い、この洗浄液を当初の溶液と合わせた。そして、pHをピリジンで中性にし、凍結乾燥した。

【0102】凍結乾燥物を500mlの10% (V/V) メタノール（分析等級）含有ジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した。これによってpHの値は5になり、この溶液をオイル浴で加熱（85℃、16時間）した。加熱終了に際して+4℃で500mlのH₂Oを加えて反応混合物を冷却し、さらにNaOHによってpHの値を8に調整した。つぎに、この溶液を、300ダルトンカットオフ透析膜を用いて蒸留水に対して透析を実施した後、凍結乾燥した。これによって、3.25g（65%）の化合物を回収することができた。

【0103】(B) ガラクトサミンの6位にある水酸基の硫酸化

欧州特許第214879号の記載にもとづいて反応を実施した。

【0104】先行するステップによって単離された化合物3gを150mlの蒸留水に溶解した。酸のかたちになった6gのアンバーライト樹脂（商標、AmberliteR resin）を加えて10分間攪拌した。この樹脂溶液を濾過した後、pHの値を10% (w/v) トリブチルアミン含有エタノール溶液で5に調整した。そして、減圧かつ室温下で有機溶媒を除去し、溶液を凍結乾燥した。その結果、5.05gの脱硫酸化デルマトントリブチルアンモニウム塩を回収した。これをさらに110mlのジメ

チルフォルムアミド (DMF) に溶解し、続いてこれに4.12gの付加ピリジン-SO₃を含有する50mlの無水DMFを加えた。室温で1時間ゆっくり攪拌することで反応が行われ、+4℃の温度で蒸留水160mlを加えて冷却することによって反応を停止させた。pHの値をNaOHで9に調整した。このような条件下で、最終産物のトリブチルアンモニウム塩が沈殿した。脱錯形成を行う為に、得られた塩を酢酸ナトリウム飽和エタノールに懸濁した。この際、酢酸ナトリウム飽和エタノールは300mlを3回連続して新しく換えた。固体を0.25MのNaCl溶液（200ml）に溶解し、この溶液を、3500ダルトンカットオフ透析膜を用いて蒸留水に対して透析を実施した。その後、NMRスペクトラムによって、ガラクトサミンの6位にある炭素原子が硫酸基によって置換されたことに一致する96ppmのシグナルが認められた。同一スペクトラムから、ガラクトサミンの6位にある未反応の水酸基の残りの量は5%以下であると考えられる。

【0105】

【発明の効果】以上説明したように、本発明にもとづくポリサッカリド適用方法は、急性神経障害治療薬のプレバレーションにポリサッカリドを用いることを特徴とするもので、神経障害は毒、外傷および虚血が原因である急性神経障害である。この神経障害は毒が原因である急性神経障害である。また、好ましくは、ポリサッカリドはグリコサミノグリカンおよびその混合物、分画またはその誘導体であることを特徴とする。このグリコサミノグリカンはヘパリン、ヘパリン硫酸、コンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸、またはグリコサミノグリカンの混合物からなる。したがって、ポリサッカリドは神経細胞での神経突起または軸索の形成に対するPMA（4b-ホルボール-12b-ミリステート-13a-アセテート）の阻害効果に対して拮抗し、またインビトロ実験においてポリサッカリドは、神経毒化合物投与、虚血または外傷によって誘発される神経系の病的状態を改善するので、ポリサッカリド、特にグリコサミノグリカンは外傷および虚血性末梢神経障害の治療、さらには毒性末梢神経障害の治療に好適に用いることができる。

フロントページの続き

(72)発明者 ベニート カス
イタリア 20133 ミラノ ヴィア ジ.
コロンボ 81ア

(72)発明者 ローラ フェルロ
イタリア 20121 ミラノ ヴィア プレ
ラ 24/6

THIS PAGE BLANK (USP 10)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USP 10)